Über Anzahl und Art der Membranproteine im Lamellarsystem der Chloroplasten

GÜNTER BAUER-STÄB

1960

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0054

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

ÜBER ANZAHL UND ART DER MEMBRANPROTEINE IM LAMELLARSYSTEM DER CHLOROPLASTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Dipl.Chem. Günter Bauer-Stäb
aus
Ludwigsburg (Württ.)
1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Braunitzer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 7. 1968

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Braunitzer am Max-Planck-Institut für Biochemie in München in der Zeit von Mai 1965 bis Dezember 1967 durchgeführt.
Herrn Professor Dr. A. Butenandt danke ich sehr für die großzügige Förderung meiner Arbeit und Herrn Professor Dr. G. Braunitzer für seine vielen Anregungen und Ratschläge. In Dankbarkeit gedenke ich meines verstorbenen Kollegen Dr. R. Schmitz. Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. Tanner (Botan. Institut der TH München). Beide Herren haben mich durch wertvolle Diskussionen und durch Überlassung von Ausgangsmaterialien unterstützt. Für die Durchführung der Aminosäureanalysen danke ich Herrn Dr. K. Krejci (Physiol.-chem. Institut der Universität München) und Frau K. Steinhoff.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Das "W-Protein"	5
2.1	Gelfiltration	5
2.2	Chromatographie über Ionenaustauscher	7
2.3	Stärkegel-Elektrophorese	7
2.4	Enzymatische Hydrolyse	7
3	Analytische Untersuchungen an nativen Chloroplastenlamellen	8
3.1	Lösung der Chloroplastenlamellen	8
3.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Phenolsystem	9
	3.2.1 Methode	9
	3.2.2 Elektrophorese der Chloroplastenlamellen des Spinats	11
	3.2.3 Phylogenetische Studien	17
3.3	Disc-Elektrophorese	22
3.4	Untersuchung in der Ultrazentrifuge	23
4	Präparative Isolierung der Lamellarproteine	24
4.1	Gelfiltration	24
4.2	Gegenstromverteilung	28
5	Chemische Modifizierung der Lamellarproteine	30
5.1	Umsetzung mit Bernsteinsäure- und Maleinsäure-Anhydrid	30
5.2	Gel-Elektrophoresen	31
5.3	Chromatographie über DEAE-Cellulose	32
6	Aminosäureanalysen	35

7 Enzymatische Hydrolyse 38

7.1 Gelfiltration der Peptide 38

7.2 Zweidimensionale Papierchromatographie 39

8 Diskussion 41

Experimenteller Teil

Aufarbeitung der Pflanzen 47

W-Protein 48

Stärkegel-Elektrophorese 49

Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Phenolsystem 49

Entfernung der Lipide und Chlorophylle 51

Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid 51

Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid 52

Disk-Elektrophorese 52

Gegenstromverteilung 52

Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose 53

Enzymatische Hydrolyse mit Thermolysin 55

Zweidimensionale Papierchromatographie (Print-Technik) 55

Zusammenfassung 56

Literaturverzeichnis 57

Abkürzungsverzeichnis:

Phenolsystem	=	System Phenol/Ameisensäure/Wasser (2:1:1)
SDS	=	Natrium-Dodecylsulfat oder Natrium-Laurylsulfat
W-Protein	=	Nach der Methode von Weber[14] aus Chloroplastenlamellen gewonnenes Protein
DEAE	=	Diäthylaminoäthyl
Tris	=	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ATP	=	Adenosintriphosphat

1 Einleitung

Die Photosynthese, d.h. die Umwandlung von Sonnenenergie in chemische Energie, ist der qualitativ und quantitativ wichtigste chemische Prozeß, der sich auf der Erde abspielt. Sie stellt die Energie für alle chemischen Reaktionen zur Verfügung, deren Summe man als Leben bezeichnet. Darüber hinaus sind ihre Produkte direkt oder indirekt auch die hauptsächliche Energie- und Rohstoffquelle der Industrien. Durch sie werden pro Jahr ca. 200 Milliarden Tonnen Kohlenhydrate aus Kohlendioxid und Wasser erzeugt.

Die Entwicklung der Photosyntheseforschung war von Aristoteles und Theophrast bis ins 19. Jahrhundert durch die einseitige Betrachtung des Stofflichen gekennzeichnet. Aristoteles' Ansicht, daß die Pflanzen ihre Nahrung aus der Erde erhalten, herrschte bis ins frühe 17. Jahrhundert vor. Erst van Helmont (1577 - 1644) stellte die Theorie auf, daß die Erde zum Pflanzenwachstum nichts beitrage, eine in dieser Ausschließlichkeit ebenfalls falsche Aussage.
Weitere Stationen der Photosyntheseforschung waren die Entdeckung der Rolle des Lichts (Ingen-Housz, 1730-1799) und des Sauerstoffs (Priestley, 1733 - 1804). Senebier (1742-1809) brachte als erster klar zum Ausdruck, daß die Pflanzen Kohlendioxid verbrauchen.
Einen Durchbruch brachten die Arbeiten Julius Robert Mayers[1] (1814-1878): er stellte die Rolle des Sonnenlichts, den Energieumsatz in den Mittelpunkt seiner Betrachtungen. Weitere Höhepunkte waren die Arbeiten Willstätters über die Chemie der Chlorophylle[2], die Messung von Aktionsspektren an Chlorella durch Warburg und Negelein (1923)[3], die Entdeckung der Hill-Reaktion (Hill 1937)[4], die Arbeiten Menkes über die Struktur

der Chloroplasten[5)], die Aufklärung der Dunkelreaktion der Photosynthese durch Calvin[6)] und schließlich die Totalsynthese des Chlorophylls durch Woodward[7)].

Die Photosynthese der grünen Pflanzen findet in hochspezialisierten Organellen, den Chloroplasten statt. Hill gelang es 1937, eine Teilreaktion der Photosynthese, die Entwicklung von Sauerstoff an isolierten Chloroplasten nachzuweisen[4)]. Er bewies damit die funktionelle Autonomie dieser Partikel. Hinweise auf eine genetische Autonomie ergaben sich durch das Auffinden von Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Chloroplasten[8)]. Dieser Befund stützt die Hypothese, daß Chloroplasten einst aus autonomen Organismen hervorgegangen sind, die in Symbiose mit den Pflanzen lebten und im Verlauf der Entwicklung in die Pflanzenzelle integriert wurden. Eine andere Hypothese geht davon aus, daß die Chloroplasten durch Einstülpung der Zellmembran entstanden sind. Eine Entscheidung wird möglich werden durch Vergleich der Desoxyribonukleinsäuren aus Zelle und Chloroplasten, oder durch Vergleich der Membranproteine aus Zellwand und Chloroplasten, bzw. durch phylogenetische Studien der Strukturproteine verschiedener Pflanzen.

Durch elektronenmikroskopische Arbeiten Menkes[5)] sowie Mühlethalers und Weiers konnte die Feinstruktur der Chloroplasten aufgeklärt werden. Einen wertvollen Beitrag hierzu lieferte die Röntgenkleinwinkelstreuung, die von Kreutz[11)] auf Chloroplasten angewandt wurde.

Chloroplasten bestehen aus einem System von L a m e l l e n, die nach Menke als T h y l a k o i d e bezeichnet werden. Sie sind in sich geschlossene Doppellamellen. Diese Thylakoide verdichten sich in manchen Bereichen zu enggeschichteten Stapeln, den sogenannten Grana: die unstrukturiert erscheinenden Bereiche zwischen den Thylakoiden werden Stroma genannt.

Aus Untersuchungen von Arnon[9] und Trebst[10] ist bekannt, daß die Primärreaktion der Photosynthese. d.h. der Lichteinfang,in den Lamellen, die Dunkelreaktion der Kohlendioxydreduktion ("Calvinzyklus") dagegen im Stroma stattfindet.
In den Lamellen sind alle photosynthetischen Pigmente und Lipide lokalisiert, wie Chlorophylle, Carotinoide, Chinone, Phospholipide, Galactosylglyceride, Sulfolipide u.a. Diese Verbindungen machen ungefähr die Hälfte des Trockengewichts der Lamellen aus. Die andere Hälfte besteht aus dem sogenannten Struktur- oder Membranprotein. Den Namen Strukturprotein erhielt das Protein wegen seiner extremen Unlöslichkeit. Ob es diesen Namen zu Recht trägt, d.h. ob es tatsächlich nur die Aufgabe hat, eine bestimmte Struktur aufrechtzuerhalten oder auch noch eine weitere Funktion erfüllt, läßt sich beim heutigen Stand unseres Wissens noch nicht sagen.
Die Unlöslichkeit der Thylakoide als Membranproteine stellt für die chemische Untersuchung ein großes Hindernis dar. So konzentrierten sich zunächst die Bemühungen darauf, die Lamellen in Lösung zu bringen. Dies gelang bereits Emil Smith (1941) mit Hilfe von Natrium-Laurylsulfat (SDS)[12]. Versuche von Kahn mit Triton X-100 (p-Octylphenyläther des Polyäthylenglykols)[10] brachten nur eine teilweise Lösung der Chloroplastenlamellen[13]. Weber gelang es 1963, die Lamellen durch Behandlung mit reiner Ameisensäure in Lösung zu bringen[14].

Bei der Aufnahme der hier beschriebenen Untersuchungen herrschte noch Ungewißheit darüber, ob das Membranprotein nur aus einer Komponente besteht oder ob es einen Komplex aus mehreren Proteinen darstellt. Die Versuche von Weber[14] wiesen auf ein einheitliches Protein hin. Dagegen legten Beobachtungen von Menke und Jordan[15] sowie von Thornber et al.[16] die Annahme mehrerer Komponenten nahe.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit werden analytische Methoden beschrieben, die eine Auftrennung der Thylakoidproteine aus Spinatblättern ermöglichen: es konnte gezeigt werden, daß das Protein der Lamellen aus drei Hauptkomponenten besteht, die im folgenden als α-, ß- und γ-Komponenten bezeichnet werden.
Die Ausdehnung der Untersuchungen auf andere Pflanzen ergab gleiche Ergebnisse für phylogenetisch sehr verschiedene Pflanzen. Lediglich Spaltpflanzen zeigten Abweichungen.

Der zweite Teil der Arbeit ist auf eine zukünftige Sequenzanalyse der Proteine abgestellt. Es gelang, die einzelnen Komponenten präparativ zu trennen und durch quantitative Aminosäureanalyse zu charakterisieren. Durch chemische Modifizierung konnten die Proteine schließlich in eine wasserlösliche Form gebracht werden und durch enzymatische Hydrolyse und Print-Technik vorläufig charakterisiert werden.

2 Das "W-Protein"

Den Ausgangspunkt der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen bildeten die Arbeiten Webers[14]. Ihm gelang es, die Chloroplastenlamellen in eine wasserlösliche Form zu bringen, indem er sie in reiner Ameisensäure löste und die Lipide mit einem Äther-Petroläther-Gemisch extrahierte. Als Produkt erhielt er nach Lyophilisieren ein gelbliches Protein, das in Puffern mit einem pH-Wert über 7 löslich war. Diese Substanz wird im folgenden als W-Protein bezeichnet.

2.1 Die Gelfiltration

des W-Proteins über eine Säule (2x100 cm) aus Sephadex G 100 wurde in einem Tris · HCl-Puffer vom pH 8,1 und einem 8 molaren Harnstoffgehalt durchgeführt. Auch in diesem dissoziierenden Medium wurde das Protein als einheitlicher Gipfel aus der Säule eluiert (s. Abb.1). Unmittelbar nach dem gelb gefärbten W-Protein erschien ein kleiner Gipfel, dessen UV-Spektrum auf eine Nucleinsäure hindeutete.
Die Gelfiltration führte zwar nicht zur Auftrennung in verschiedene Proteine, sie stellt aber eine gute Methode zur weiteren Reinigung des W-Proteins dar. Die Fraktionen des Hauptgipfels wurden auf einer Säule aus Sephadex G 25, das mit einer 0,5 - 1 %igen Ammoniumbicarbonatlösung äquilibriert war, von Salzen und Harnstoff befreit und gefriergetrocknet.

Die Gelfiltration in einem System aus 50 % des genannten Tris-Puffers und 50 % Dimethylformamid führte zum gleichen Ergebnis.

Abb. 1 : Gelfiltration des W-Proteins über Sephadex G 100 . Puffer: 0,02 m Tris·HCl pH 8,1, 8m Harnstoff.
Ordinate: Extinktion bei 275 nm.
Der 1. Gipfel ist Protein, der letzte Dinitrophenol, das der Proteinprobe zur Bestimmung des Elutionsvolumens kleiner Moleküle zugesetzt wurde.

2.2 Chromatographie über Ionenaustauscher

Infolge der sehr stark ausgeprägten adsorptiven Eigenschaften des W-Proteins waren Versuche zur Säulenchromatographie mit den Ionenaustauschern Dowex 1x2, IRC-50 und DEAE-Sephadex A50 erfolglos: das Protein wurde irreversibel adsorbiert. Auch über DEAE-Cellulose konnte das Protein mit Hilfe eines 1 molaren Natriumcitratgradienten lediglich in einer Ausbeute von 11 % chromatographiert werden.

2.3 Stärkegel-Elektrophorese

Bei der Stärkegel-Elektrophorese nach Smithies verteilte sich das Weber-Protein trotz Verwendung von 8 molarem Harnstoff sowohl im Sauren (pH 3,5) als auch im Alkalischen (pH 8,9) über eine große Strecke.

2.4 Enzymatische Hydrolyse

Die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin, Elastase spalteten nicht zufriedenstellend. Es blieb in allen Fällen ein beträchtlicher ungespaltener Rückstand.

Alle diese Versuche schienen die Einheitlichkeit des Chloroplastenstrukturproteins zu bestätigen. Erst durch die Entwicklung einer neuen analytischen Methode stellte sich heraus, daß der beschrittene Weg über das W-Protein zur Aufklärung der chemischen Struktur der Chloroplastenlamellen nicht geeignet ist.

3 Analytische Untersuchungen an nativen Chloroplastenlamellen[+)]

3.1 Lösung der Chloroplastenlamellen

Angesichts des hohen Gehalts der Lamellen an Lipiden und der daraus resultierenden extremen Wasserunlöslichkeit schien es geraten, nach einem Lösungsmittel zu suchen, das gutes Lösungsvermögen für Lipide mit einer stark dissoziierenden Wirkung auf Proteine vereint. Als nächstliegende Substanzen boten sich oberflächenaktive Stoffe an, die sich bereits bewährt hatten. Dabei sind jedoch nur die Lösungen der aktivsten Detergentien wie z.B. Natrium-Dodecylsulfat (SDS) im Stande, die Lamellen vollständig zu lösen. Mittel wie Triton X 100 lösen nur einen Teil.

Bei der Gelfiltration der SDS-gelösten Chloroplastenlamellen trat jedoch keine Auftrennung in verschiedene Proteine auf, nicht einmal eine Trennung von Chlorophyll und Protein. Auf Grund dieses Befundes und wegen der Schwierigkeit, das einmal mit Netzmittel behandelte Protein wieder von diesem zu befreien, wurde diese Methode ausgeschieden.

Angeregt durch die Feststellung Craigs[17)], daß Phenol eines der am stärksten dissoziierenden Lösungsmittel sei, wurde schließlich ein System gefunden, das allen Anforderungen gerecht wurde: Das Lösungsmittelsystem aus Phenol, Ameisensäure und Wasser im Verhältnis 2:1:1 (Gewicht:Volumen:Volumen), im folgenden kurz als "Phenol-System" bezeichnet, besitzt gutes Lösungsver-

---

[+)] Der Inhalt dieses Kapitels wurde auszugsweise veröffentlicht in: Naturwissenschaften 54, 70 (1967)[23)].

mögen für die Lipide der Lamellen, starke dissoziierende Wirkung auf Proteine, und das Protein ist aus ihm leicht wieder zu gewinnen.
In diesem System lösen sich die Lamellen rückstandslos auf.

3.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Phenolsystem

3.2.1 Methode

Bei der Suche nach einem geeigneten Trägermaterial für die Elektrophorese im Phenolsystem bot sich, nachdem das bewährte Stärkegel sich als ungeeignet erwiesen hatte, die von Ornstein und Davis[18] sowie Raymond[19] im Jahre 1959 entwickelte Methode der Polyacrylamid- bzw. Disc-Elektrophorese an.

Polyacrylamid-Gel ist thermostabil, transparent und mechanisch stabil, es besitzt keine ionischen Gruppen und kann in verschiedenen Porengrößen hergestellt werden. Darüber hinaus ist es chemisch weitgehend inert, eine wichtige Voraussetzung für seine Verwendung im aggressiven Phenolsystem.

Leider erwies es sich als unmöglich, Acrylamid im Phenolsystem zur Polymerisation zu bringen. Daher konnte nicht auf die bestens ausgearbeitete Methodik und die im Handel befindlichen Apparaturen zurückgegriffen werden. Bei diesen wird die Monomerenlösung zusammen mit der Radikale liefernden Substanz (Ammoniumperoxodisulfat) in Röhrchen von etwa 6 mm innerem Durchmesser eingefüllt. Nach der Polymerisation sind die Röhrchen mit den Gelen gebrauchsfertig.

Um die Elektrophorese im Phenolsystem durchführen zu können, wurde das Gel in Form von Platten mit den Ausmaßen 70x70x2 mm hergestellt. Diese Platten wurden zur

Entfernung von Salzen gründlich gewässert und dann solange im Phenolsystem bewegt, bis dieses ganz ins Gel eingedrungen war. Anschließend wurde das Gel in eine Glaskammer gebracht und mit Schlitzen zur Einbringung der Substanzproben versehen.
Die zu analysierende Proteinprobe konnte entweder auf Filterpapier aufgesogen oder mit Biogel angeteigt in den Schlitz eingeführt werden. Am einfachsten erwies sich jedoch das direkte Einfüllen der Proteinlösung in den Schlitz mit Hilfe einer Pipette. Voraussetzung für diese Art der Einbringung war jedoch, daß sich zwischen Glasplatte und dem daraufliegenden Gel kein Flüssigkeitsfilm befand, da sonst die Proteine unter dem Gel schneller wanderten als in diesem. Den Aufbau der Elektrophorese-Apparatur zeigt Abb. 2.

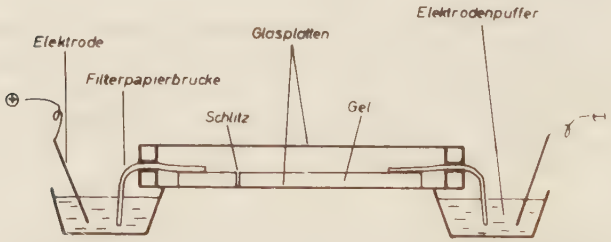

Abb. 2 : Apparatur für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Phenolsystem.
Gelpuffer: Phenol/Ameisensäure/Wasser (2:1:1).
Elektrodenpuffer: 10 %ige Ameisensäure.
Die Strombrücken bestehen aus einer 3-fachen Lage Filterpapier.

Die Vorteile der Polyacrylamid-Elektrophorese in Platten gegenüber der Disk-Elektrophorese in Röhrchen bestehen

a) in der Abwesenheit von Peroxodisulfat und monomerem Acrylamid, die vor der Elektrophorese aus dem Gel ausgewaschen werden können; Peroxodisulfat verursacht oft Artefakte durch Oxydation der Proteine[20];

b) in der Möglichkeit, mehrere Proben in einem Gel parallel laufen zu lassen; Vergleiche zwischen mehreren Proteinen können dadurch wesentlich exakter angestellt werden als bei der Disk-Elektrophorese, bei der jede Probe in einem eigenen, von den anderen getrennten Gelstück läuft;

c) in der Möglichkeit, praktisch alle Lösungsmittelsysteme verwenden zu können, während bei der Disk-Elektrophorese in Röhrchen nur diejenigen Puffer angewandt werden können, in denen Acrylamid polymerisiert.

Ein Nachteil dieser Methode ist lediglich die wesentlich kompliziertere Handhabung.
Alle im folgenden erwähnten Elektrophoresen wurden unter Anwendung dieser Methode durchgeführt, sofern nicht ausdrücklich anderes angegeben ist.

3.2.2 Elektrophorese der Chloroplastenlamellen des Spinats

Spinat (Spinacia oleracea) ist als Objekt der Photosyntheseforschung bereits gut eingeführt. da er jederzeit und in beliebiger Menge erhältlich ist und weil er leicht homogenisierbare Blätter besitzt. Aus diesen Gründen war er auch das hauptsächliche Objekt der vorliegenden Untersuchungen.

Inwiefern Einwendungen wegen einer evtl. genetischen

Unterschiedlichkeit verschiedener Sorten der gleichen Pflanze (wie z.B. des Spinats) berechtigt sind, läßt sich heute noch nicht entscheiden. Es wurde jedoch festgestellt, daß die Hämoglobine der Menschen aller Rassen gleiche Primärstruktur besitzen[21], abgesehen von abnormalen Individuen. Ein Strukturprotein sollte im Vergleich dazu noch stabiler gegen Mutationen sein, da jede Veränderung der Struktur die Beziehungen zu seiner Umgebung und dadurch dessen Funktion stören würde.

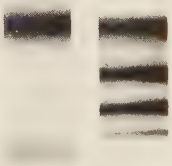

Abb. 3 : Bandenmuster von Chloroplastenlamellen aus Spinat nach der Elektrophorese im Phenolsystem
a) ohne Anfärbung
b) nach der Anfärbung mit Amidoschwarz.

Unmittelbar nach der Elektrophorese der Chloroplastenlamellen waren im Gel zwei Banden sichtbar: eine langsame gelbe und eine schnelle blaugrüne Bande (s.Abb. 3 a). Die Spektren der beiden Banden zeigt Abb. 4 .

a)

b)

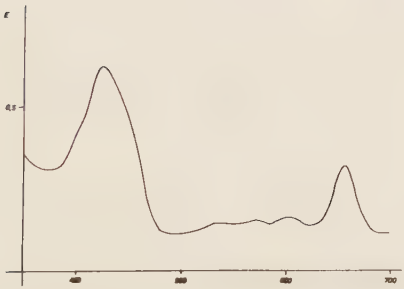

Abb. 4: Spektren der beiden gefärbten Banden aus der Gelelektrophorese von Chloroplastenlamellen aus Spinat (s.Abb. 3) :

a) schnelle Bande

b) langsame Bande

Nach der Anfärbung des Gels mit Amidoschwarz wurden drei Protein-Banden sichtbar, die α-, ß- und γ-Banden genannt seien. Außer diesen drei Hauptbanden sind noch einige Nebenbanden von geringerer Intensität sichtbar.

Die densitometrische Auswertung ergibt ein ungefähres Bild der Mengenverhältnisse der einzelnen Proteine (s.Abb. 5). Unter der - sicher nur bedingt zulässigen - Annahme gleicher Anfärbbarkeit verschiedener Proteine und der Annahme der Proportionalität der Anfärbung erhält man folgende Verhältniszahlen für den Proteingehalt der drei Banden:

$$\alpha : \beta : \gamma = 5{,}2 : 2{,}6 : 1$$

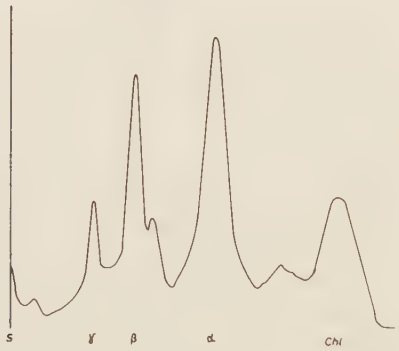

Abb. 5 : Densitogramm des Bandenmusters einer Gelelektrophorese von Spinatchloroplastenlamellen nach Anfärbung mit Amidoschwarz. S = Start.

Versuche mit Gelen verschiedener Porenweite.

Oft ist es möglich, die Auftrennung eines Proteingemischs durch Veränderung der Gelkonzentration und damit der Porengröße des Gels zu verbessern.
Versuche mit Gelkonzentrationen von 7,5 % und 15 % zeigten die schon beobachteten drei Hauptbanden. Die elektrophoretische Beweglichkeit nahm erwartungsgemäß mit abnehmender Porenweite ab (s.Tab. 1). Bei keinem Gel blieb jedoch Substanz am Start zurück.

	α	ß	γ	Globin
5	0,73	0,53	0,39	1,15
7,5	0,60	0,36	0,24	
10	0,53	0,32	0,22	
15	0,45	0,26	0,18	

Tabelle 1 : Relative Beweglichkeiten der Proteinkomponenten der Spinatchloroplastenlamellen in Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentrationen, bezogen auf die schnelle grüne Bande (Chl).

Die elektrophoretische Beweglichkeit m ist definiert als

$$m = d/t \cdot V ,$$

d.h. als Quotient aus der Laufstrecke d und dem Produkt aus Laufzeit t und der am Gel liegenden Spannung V .

In praxi ist dieser Quotient jedoch nicht immer leicht bestimmbar, sei es wegen eventueller Inhomogenitäten des Gels oder weil die angelegte Spannung nicht während des ganzen Laufes konstant bleibt. Auch die Außentemperatur hat einen Einfluß auf die Beweglichkeit. Um trotz dieser Schwierigkeiten ein exaktes und reproduzierbares

Ergebnis zu erhalten, ist in Tab. 2 nicht die absolute Beweglichkeit m angegeben, sondern die relative Beweglichkeit m_r , bezogen auf die schnelle blaugrüne Chlorophyllbande als internen Standard:

$$m_r = \frac{m}{m_{Chl}} = \frac{d \cdot t \cdot V}{t \cdot V \cdot d_{Chl}} = \frac{d}{d_{Chl}}$$

Zum Vergleich ist außer den relativen Beweglichkeiten der Lamellarproteine aus Spinatchloroplasten auch die der Hauptkomponente des menschlichen Globins aufgeführt.

Es stellt sich die Frage nach den Möglichkeiten und Grenzen der geschilderten Methode und nach dem Aussagewert der damit erzielten Ergebnisse.
Die Trennschärfe,die bei der Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamidgel erzielt werden kann, wird derzeit von keiner anderen Methode erreicht. Die Auftrennung mehrerer Proteine wird dabei hauptsächlich durch zwei Kriterien bestimmt: Ladung und Größe bzw. Gestalt der wandernden Teilchen. Das erstgenannte Kriterium tritt bei der Elektrophorese im stark sauren Phenolsystem gegenüber dem zweiten zurück, wie später gezeigt werden wird (s.S. 24). Eine Auftrennung von Proteinen wird also dann nicht möglich sein, wenn diese sehr ähnliche Größe und Gestalt besitzen. Es kann folglich auf Grund der Gelelektrophorese grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, daß die gefundenen Komponenten jeweils aus mehreren sehr ähnlichen Proteinen bestehen.
Die Möglichkeit, daß das Lamellarprotein einheitlich ist, und daß zwei der drei gefundenen Komponenten Artefakte sind, konnte weitgehend ausgeschlossen werden. Solche Artefakte werden in erster Linie durch teilweise Oxidation der Proteine durch das im Gel befindliche Peroxodisulfat verursacht [20]. Bei der hier beschriebenen Methode werden jedoch alle niedermolekularen Verunreinigungen vor

der Elektrophorese ausgewaschen. Auch bei Zusatz eines Reduktionsmittels (0,5 % Mercaptoäthanol) ergab sich das gleiche Bandenmuster.
Auch die in der Literatur beschriebene Komplexbildung zwischen Lösungsmittel und Protein und eine dadurch verursachte Aufspaltung eines Proteins in mehrere verschieden wandernde Protein-Lösungsmittel-Komplexe[22] konnte ausgeschlossen werden: unterwirft man die einzelnen präparativ gewonnenen Komponenten erneut der Elektrophorese, so tritt nurmehr eine einzige Proteinbande auf (s. S. 24ff).

3.2.3 Phylogenetische Studien[23]

Die primitivsten pflanzlichen Organismen sind die photosynthetisch aktiven Bakterien und die Blaualgen (Cyanophyceen). Auch bei diesen kernlosen Lebewesen sind die Photosynthese-Pigmente an ein Lamellarsystem gebunden[24]. Es lag daher nahe, am Beispiel des Purpurbakteriums Rhodopseudomonas spheroides und der Blaualge Oscillatoria chalybea den Aufbau der Lamellen mit Hilfe der Gel-Elektrophorese im Phenolsystem zu untersuchen und ihn mit dem höherer Pflanzen zu vergleichen. Übergangsformen zwischen Cyanophyceen und höheren Algen kennt man nicht[25].
Als phylogenetisch nächsthöhere Pflanze wurde die Grünalge Chlorella ausgewählt, die bereits von Warburg in die Photosyntheseforschung eingeführt wurde.
In der Gruppe der höheren Pflanzen wurde die gelbrote Taglilie Hemerocallis fulva L. als Vertreterin der einkeimblättrigen (Monocotyledoneae) und Spinat (Spinacia oleracea) als Vertreter der zweikeimblättrigen Pflanzen ((Dicotyledoneae) untersucht.
Zur besseren Untermauerung der Ergebnisse wurden auf dem phylogenetischen Niveau der Zweikeimblättrigen außer Spinat noch zwei andere Pflanzen untersucht: Salat (Lactuca sativa) und Löwenmäulchen (Antirrhinum majus). Die Struktur der Chloroplasten aus Antirrhinum ist

dank der elektronen-mikroskopischen Untersuchungen Menkes[5] gut bekannt.
Die Ergebnisse dieser Studien sind aus den Abb. 6 - 12 ersichtlich. Die Kurven sind entstanden durch densitometrische Auswertung der mit Amidoschwarz angefärbten Gele bzw. der von diesen angefertigten photographischen Aufnahmen. Der Startschlitz der Elektrophorese ist im folgenden jeweils mit S gekennzeichnet.

Abb. 6 : Rhodopseudomonas spheroides (Purpurbakterium)

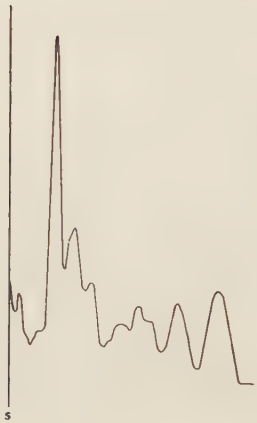

Abb. 7 : Oscillatoria chalybea (Blaualge).

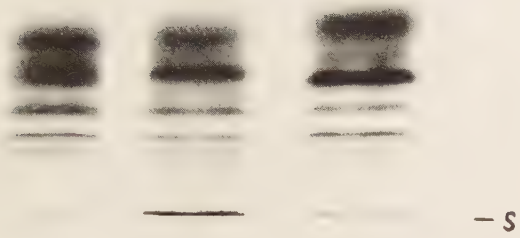

Abb. 8 : Pherogramm der Chloroplastenlamellen verschiedener Pflanzen nach Anfärbung mit Amidoschwarz. Von links nach rechts: Spinacia oleracea (Spinat), Hemerocallis fulva L. (gelbrote Taglilie), Chlorella vulgaris (Grünalge).

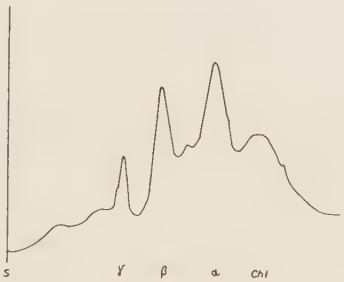

Abb. 9 : Hemerocallis fulva L. (gelbrote Taglilie).

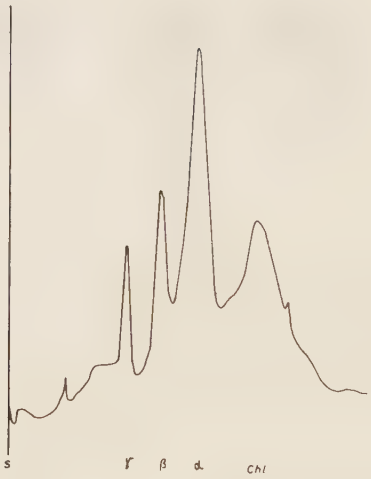

Abb. 10 : Chlorella vulgaris (Grünalge) .

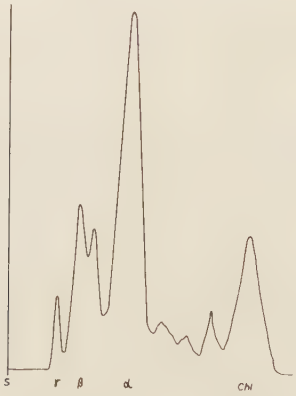

Abb. 11 : Antirrhinum majus (Löwenmäulchen)

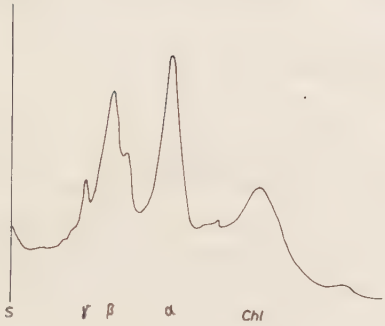

Abb. 12 : Lactuca sativa (Salat).

Die Abbildung 8 sowie die zugehörigen Densitogramme (Abb. 5,9,10) führen die grundsätzliche Gleichheit der Bandenmuster deutlich vor Augen. Unterschiede bestehen in der Wanderungsgeschwindigkeit und in den Intensitätsverhältnissen der Banden.
Auch die Abbildungen 11-12, die zwei Pflanzen von gleicher Entwicklungshöhe darstellen, sind unter sich sehr ähnlich.
Dagegen zeigen die Abbildungen 6 und 7 ein gänzlich anderes Bandenmuster. Das Purpurbakterium Rhodopseudomonas spheroides zeigt eine Anzahl von Banden, die sich in Zahl, Lage und Intensität mit den Banden des Spinats nicht korrelieren lassen.
Die Blaualge Oscillatoria zeigt e i n e Hauptbande neben mehreren schwächeren Banden.

Auf Grund der hier vorgelegten Untersuchung liegt die Vermutung nahe, daß die chemische Struktur der photosynthetischen Apparate bei allen Pflanzen bis zu den Grünalgen grundsätzlich gleich ist. Dagegen scheinen die entwicklungsgeschichtlich älteren Blaualgen und Purpur-

bakterien andere photosynthetische Apparate zu besitzen.

3.3 Disk-Elektrophorese

Unter Zuhilfenahme des Netzmittels Natrium-Laurylsulfat (SDS) wurden die Untersuchungen der nativen Lamellen auch bei einem höheren pH-Wert durchgeführt.
Gefriergetrocknete Chloroplastenlamellen wurden in 7 %iger Essigsäure suspendiert, mit einer Amidoschwarzlösung versetzt und etwa 1 Stunde gerührt. Die angefärbten Lamellen wurden abzentrifugiert und solange mit 7 %iger Essigsäure gewaschen, bis der Überstand nur noch schwach blau war. Dann wurde noch zweimal mit Wasser gewaschen und das Sediment in Tris-Puffer vom pH 8,6, der 1 %ig an SDS und 8 molar an Harnstoff war, aufgenommen. Diese Lösung wurde der Disk-Elektrophorese im Ornstein-System[18] bei pH 8,6 unterworfen. Nach Anfärbung mit Amidoschwarz zeigten sich zwei Banden mit sehr verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten (s.Abb. 13).

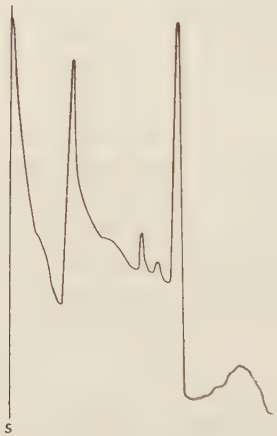

Abb. 13 : Densitogramm der Disk-Elektrophorese von SDS-behandelten Chloroplastenlamellen aus Spinat. Bedingungen der Elektrophorese: Tris.HCL-Puffer pH 8,6; Stromstärke konstant bei 5 mA/Röhrchen; Laufzeit 60 Minuten.

Am Start blieb jedoch ein großer Teil der aufgebrachten Substanz zurück. Insofern ist diese Methode der Gel-Elektrophorese im Phenolsystem deutlich unterlegen. Die Ergebnisse wurden deshalb nicht weiter verfolgt.

3.4 Untersuchung in der Ultrazentrifuge

Die Untersuchung des Sedimentationsverhaltens wurde im System Phenol/Essigsäure/Wasser in einer analytischen Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann) durchgeführt. Bei der verwendeten Konzentration (0,1 %ig) war jedoch die optische Dichte infolge der hohen Absorption des Chlorophylls zu hoch. Daher wurden die Lamellen vorher mit Aceton von Lipiden und Chlorophyllen befreit. Daß sich durch diese Behandlung die chemische Struktur nicht ändert, bewies die Gel-Elektrophorese des lipidfreien Präparates im Phenolsystem, bei der dasselbe Proteinbandenmuster auftrat wie bei unbehandelten Lamellen.

Bei dieser Ultrazentrifugation zeigte sich e i n Gipfel, dessen Asymmetrie jedoch die Uneinheitlichkeit der Probe verriet.

4 Präparative Isolierung der Lamellarproteine

4.1 Gel-Filtration [+)]

In Anbetracht des sehr niedrigen pH-Wertes des Phenolsystems war zu vermuten, daß darin die Ladungsunterschiede von Proteinen nivelliert werden, d.h. daß die Auftrennung der Lamellarproteine der Chloroplasten mehr auf einen Molekularsiebeffekt als auf Ladungsunterschiede zurückzuführen ist.

Zur Prüfung dieser Annahme wurde zunächst eine trägerfreie Elektrophorese nach Hannig[27)] im Phenolsystem durchgeführt, um den Siebeffekt des Gels auszuschließen. Bei dieser Art von Elektrophorese tritt eine Trennung praktisch nur aufgrund von Ladungsunterschieden ein. Das Ergebnis war negativ: es zeigte sich nur e i n Proteingipfel.

Als Gegenprobe wurde ein Trennverfahren gewählt, bei dem Teilchen nur nach ihrer Größe sortiert werden: die Gelfiltration. In der Tat wurde damit eine Trennung der drei Hauptkomponenten und der Pigmente erzielt (s. Abb. 14):

Für die Gelfiltration wurde Bio-Gel P 150 (Fa.Calbiochem) gewählt, da dessen Polyacrylamid-Matrix eine höhere Stabilität gegenüber Säuren aufweist als die Polysaccharid-Matrix von Sephadex (Fa. Pharmacia, Schweden). Bio-Gel P 150 quoll im Phenolsystem sehr stark, die Durchflußgeschwindigkeit war klein, obwohl die Gelfiltration zur Erniedrigung der Viskosität des Puffers bei 37°C durch-

---

[+)] Der Inhalt dieses Abschnitts wurde auszugsweise veröffentlicht in der Zeitschrift für Naturforschung 23 b, 284 (1968)[26)].

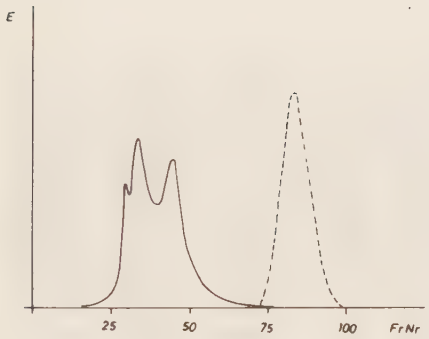

Abb. 14 : Gelfiltration der Chloroplastenlamellen aus Spinat im System Phenol/Essigsäure/ Wasser (2:1:1).
Säulenfüllung: Biogel P 150.
Ausgezogene Kurve: Ninhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse; gestrichelte Kurve Extinktion bei 667 nm.

geführt wurde. Unter diesen Bedingungen werden die Lamellarproteine im Phenolsystem irreversibel geschädigt, wie die Gelelektrophorese einer so behandelten Probe bewies. Deshalb wurde die Ameisensäure durch die schwächere Essigsäure ersetzt.

Zur Prüfung der einzelnen Fraktionen der Gelfiltration wurden diese der Gelelektrophorese im Phenolsystem unterworfen. Dabei erwies sich, daß das Protein des ersten Gipfels in seiner Wanderungsgeschwindigkeit der γ-Bande der nativen Lamellen entsprach, der zweite

Gipfel der ß-Bande und der dritte Gipfel der α-Bande (s. Abb. 15 und 16).

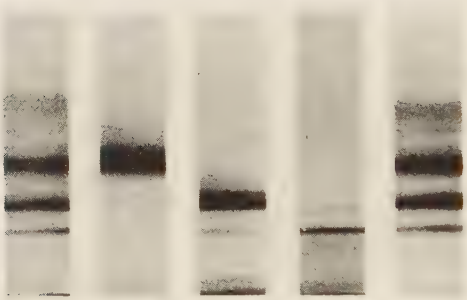

Abb. 15 : Pherogramme der drei Proteingipfel der Gelfiltration (Abb.14). Von links nach rechts: ganze Lamellen, 3. Gipfel, 2.Gipfel, 1.Gipfel, ganze Lamellen

Die Fraktionen eines Gipfels der Gelfiltration wurden jeweils vereinigt, gegen 30 %ige Essigsäure und gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

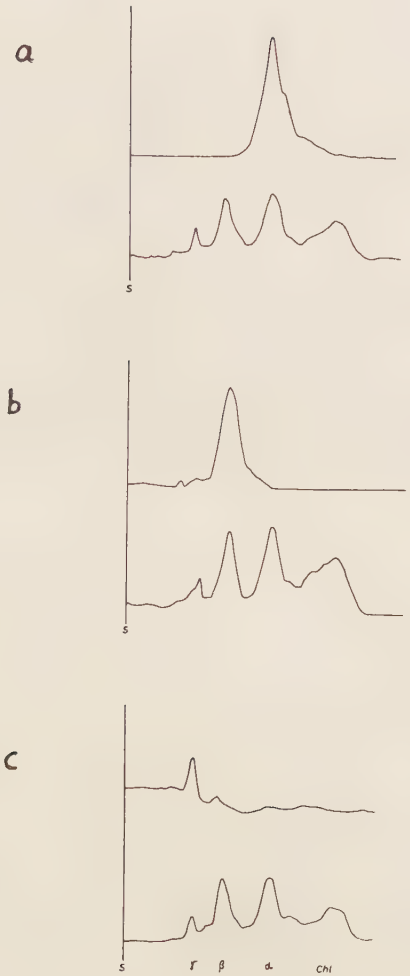

Abb. 16 : Densitogramme der Bandenmuster aus Abb. 15
In der unteren Hälfte jedes Bildes ist jeweils das Densitogramm der ganzen Lamellen als Referenz aufgetragen.
a) 3.Gipfel der Gelfiltration : α-Komponente
b) 2.Gipfel der Gelfiltration : ß-Komponente
c) 1.Gipfel der Gelfiltration : γ-Komponente.

4.2 Gegenstromverteilung

Ein weiteres Verfahren zur analytischen und vor allen Dingen präparativen Auftrennung der Lamellarproteine wurde in der Gegenstromverteilung nach Craig [28] gefunden. Als Lösungsmittelsystem erwies sich ein Gemisch aus sekundär-Butanol, Propionsäure und Wasser als geeignet, das von Hilschmann und Craig zur Fraktionierung von Bence-Jones-Protein verwendet worden war [29].

Der Verteilungskoeffizient ließ sich leicht zur Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) einstellen. Bei den vorliegenden Versuchen erwies sich eine Konzentration von 0,02 % (bezogen auf sek.-Butanol) als optimal. Sie ergab einen durchschnittlichen Verteilungskoeffizienten von 1,5. Eine multiplikative Verteilung des lipidfreien Lamellenproteins ist in Abb. 17 dargestellt:

Abb. 17 : Gegenstromverteilung der lipidfreien Chloroplastenlamellen aus Spinat.
System: Butanol-2/Propionsäure/Wasser/Trichloressigsäure.
Ausgezogene Kurve: Extinktion bei 275 nm;
gestrichelte Kurve: Ninhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse.

Die Fraktionen der Gipfel wurden gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert. Die Ausbeuten waren:

Gipfel I	31 %	60 % des eingesetzten Materials.
II	16 %	
III	13 %	

Die Verteilungskoeffizienten - berechnet nach Hecker[30] - sind:

Gipfel I: 0,08 II: 0,64 III: 7,0.

Bei der Untersuchung der einzelnen Gipfel in der Gelelektrophorese (Phenolsystem) erwies sich lediglich der zweite als weitgehend einheitlich. Er entsprach in der Beweglichkeit der ß-Bande der nativen Lamellen.
Der erste Gipfel bestand aus zwei Hauptbanden, von denen die eine die Beweglichkeit der ß-Bande aufwies. Die andere wanderte etwas schneller als die α-Bande.
Der dritte Gipfel schien aus nicht aufgetrenntem Protein zu bestehen; er wies alle drei Banden auf.

5 Chemische Modifizierung der Lamellarproteine

5.1 Umsetzung mit Bernsteinsäure- und Maleinsäure-Anhydrid

Für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Konformation und Assoziation von Proteinen, der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur, sind in erster Linie drei Arten von Wechselwirkungen verantwortlich: Wasserstoffbrücken-Bindungen, ionische Bindungen und apolare oder hydrophobe Bindungen.
Im Zuge der Evolution wurde für jedes Protein jeweils eine optimale Kombination dieser Wechselwirkungen erreicht. Mit einer Veränderung dieser Kombination geht sicherlich eine wesentliche Änderung der Struktur, des Löslichkeitsverhaltens und anderer physikalischer Eigenschaften einher.

Das Ziel weiterer Versuche war es, eine bessere Wasserlöslichkeit zu erreichen. Die Zahl der hydrophoben Bereiche eines Proteins läßt sich mit chemischen Mitteln nur vergrößern. Da das Verhältnis der apolaren zu den polaren Aminosäuren bei den vorliegenden Lamellarproteinen verhältnismäßig hoch (1,1 - 1,2)[31] liegt, schied diese Möglichkeit der Änderung der hydrophoben Bindungen aus.
Für die chemische Modifikation der ionischen Bereiche des Proteins bot sich die vor kurzem beschriebene Acylierung mit Bernsteinsäure-[32] bzw. Maleinsäure-Anhydrid[33] an. Dabei werden die basischen Lysinreste des Proteins in saure Gruppen umgewandelt. Daneben tritt auch eine Reaktion mit Tyrosin und den Hydroxy-Aminosäuren ein.

Wegen der Unlöslichkeit des Lamellarproteins mußte die Perlmansche Methode der Succinylierung[32] modifiziert werden. Das Protein wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0,5 %iger SDS-Lösung, die 10 molar an Harn-

stoff war, bei pH 10 gelöst. Das Succinanhydrid wurde bei Raumtemperatur im Lauf einer halben Stunde bei einem konstant gehaltenen pH-Wert von 8 hinzugegeben. Die Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung mit Maleinsäure-Anhydrid waren die gleichen. Lediglich die Reaktionstemperatur war niedriger: 0°C. Aus diesem Grund mußte auch die Harnstoffkonzentration auf 6 molar gesenkt werden.
Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung durch Gel-Filtration von Salzen und Harnstoff befreit und lyophilisiert. Das Produkt war ein schwach gelbliches Protein, das in basischen Puffern sehr leicht und schnell in Lösung ging.

5.2 Elektrophoretische Untersuchungen der modifizierten Lamellarproteine

5.2.1 Disk-Elektrophorese

Das Succinylderivat zeigte - der Disk-Elektrophorese im Ornsteinsystem bei pH 8,6 unterworfen - eine scharfe Hauptbande neben zwei schwachen Nebenbanden (s.Abb. 18).

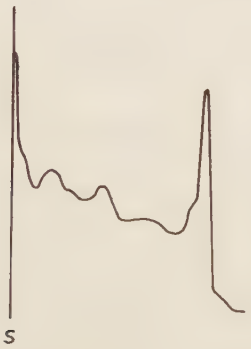

Abb. 18 : Densitogramm der Disk-Elektrophorese des succinylierten Lamellarproteins aus Spinat Bedingungen s. Abb. 15.

Das Maleoyl-Derivat zeigte dasselbe Bild. Bei beiden Proteinen blieb etwas Substanz am Start zurück. Die Wanderungsgeschwindigkeit war bei beiden Derivaten genau gleich, bei der Elektrophorese eines Gemisches der beiden Derivate trat nur e i n e Bande auf.

5.2.2 Elektrophorese im Phenolsystem

Maleoyl- wie Succinyl-Derivat waren im Phenolsystem löslich. Bei der Elektrophorese ergaben sich jedoch nur eine bzw. zwei langsam wandernde, sehr unscharfe Banden. Die mangelnde Schärfe der Banden ist wohl auf die Tatsache zurückzuführen, daß der anionische Farbstoff Amidoschwarz nur langsam auf das Protein aufzieht, das ebenfalls überwiegend anionischen Charakter besitzt.

Die Umsetzung mit Maleinsäure-Anhydrid ist im Gegensatz zur Succinylierung reversibel. Durch 40-stündiges Erwärmen des Maleoylproteins auf 40°C in einem Puffer aus Phenol, Essigsäure und Wasser (2:1:1) konnte es entacyliert werden. Nach dieser Behandlung zeigte das Protein in der Gelelektrophorese im Phenolsystem wieder drei Banden, deren Wanderungsgeschwindigkeiten mit denen der α-, β- und γ-Banden der nativen Lamellen weitgehend übereinstimmten: ein Zeichen, daß die ursprünglichen Proteine wieder hergestellt waren. Allerdings waren die Banden nicht so scharf wie bei der Elektrophorese der nativen Lamellen.

5.3 Chromatographie über DEAE-Cellulose

Die gute Wasserlöslichkeit der acylierten Proteine ließ vermuten, daß die Proteinmoleküle durch die chemische Umsetzung auch ihre starken adsorptiven und Assoziationseigenschaften verloren hatten, die bei früheren Chromatographieversuchen von nicht modifizierten Präparaten immer zu einer irreversiblen Adsorption am Säulenmaterial geführt hatten.

In der Tat erwies sich die Chromatographie der Acyl-Proteine über den Ionenaustauscher DEAE-Cellulose als durchführbar. Das Protein wurde im M/15-Phosphatpuffer vom pH 7,4 gelöst und über eine Säule chromatographiert, die mit demselben Puffer äquilibriert worden war. Nach Anlegung eines 2 molaren Kochsalzgradienten wurden etwa 20 % des Proteins eluiert (s.Abb. 19). Der Rest konnte nur mit 1 %iger SDS-Lösung von der Säule verdrängt werden.

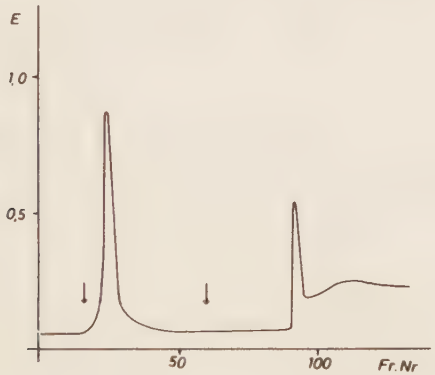

Abb. 19 : Säulenchromatographie der succinylierten lipidfreien Chloroplastenlamellen aus Spinat über DEAE-Cellulose.
Ordinate: Extinktion bei 275 nm.
Elutionsbedingungen:
Start: m/15 Phosphatpuffer pH 7,4
1.Gradient (1.Pfeil): m/15 Phosphatpuffer pH 7,4 + 2 m NaCl
2.Gradient (2.Pfeil): m/15 Phosphatpuffer pH 7,4 + 1% SDS.

Bei der Disk-Elektrophorese bei pH 8,6 wies das chromato-

graphierte Succinylprotein ebenso wie das rohe Produkt nur eine Bande auf. Auch bei der Elektrophorese eines Gemischs aus dem mit Kochsalz und dem mit SDS eluierten Protein war nur eine einzige Bande zu sehen. Diese beiden Fraktionen unterschieden sich nur dadurch, daß erstere ohne Rückstand elektrophoretisiert werden konnte, während bei letzterer ein Rückstand am Start verblieb.
Bei der Elektrophorese im Phenolsystem verhielten sich die chromatographierten Acyl-Präparate genauso wie vor der Chromatographie.

6 Aminosäureanalysen der Lamellarproteine

Die Bestimmung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung des Gesamtproteins und der chemisch modifizierten Proteine erfolgte nach der Methode von Spackman, Stein und Moore[34] in einem Aminosäureanalysator der Fa. Beckman Instruments. Zur Analyse der Einzelkomponenten wurden die Banden der Gelelektrophorese ausgeschnitten und 20 Stunden bei 110°C mit 6 n Salzsäure hydrolysiert; die Aminosäurezusammensetzung wurde mit Hilfe eines im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München (Dr. K. Krejci) entwickelten Gerätes bestimmt, bei dem für eine Aminosäureanalyse nur etwa 10 Mikrogramm Substanz benötigt werden.

Die in den Tabellen 2 und 3 angegebenen Werte sind Mikromole. Sie sind bezogen auf Leu = 1000, da diese Aminosäure durch die Hydrolyse am wenigsten zerstört wird und daher die geringsten Schwankungen zeigt.

Beim Vergleich der drei Komponenten (s.Tab 2) fällt vor allem der Unterschied der γ-Komponente gegenüber den α- und ß-Komponenten auf, der deutlich über der Fehlergrenze liegt. Er betrifft die Aminosäuren Threonin, Serin und Glycin, die einen höheren Anteil haben.
Weiter ist der geringe Gehalt der Proteine an Cystein bemerkenswert (s. Tab. 3). Auch der Histidin-Gehalt ist niedrig. Der hohe Anteil an apolaren Aminosäuren erklärt u.a. die schlechte Löslichkeit der Lamellen im Wasser.

Der Vergleich der acylierten Proteine mit den lipidfreien Lamellen zeigt einen deutlich niedrigeren Histidin-Gehalt bei ersteren. Dagegen ist ihr Gehalt an Asparaginsäure, Glycin, Serin und auch Threonin höher. Der Anteil der Aminosäure Prolin, die für die Struktur von Proteinen besonders wichtig ist, ist bei allen Derivaten erstaunlich ähnlich.

Tabelle 2 : Aminosäurezusammensetzung von :

Amino-säure	α-Komp.	ß-Komp.	γ-Komp.	Gesamt-protein
Asp	850	810	950	930
Thr	385	425	610	500
Ser	600	730	1510	660
Glu	750	860	890	935
Pro	545	485	550	675
Gly	1060	1040	1610	960
Ala	920	930	880	770
Val	520	585	640	670
Met	-	-	-	155
Ile	335	520	550	415
Leu	1000	1000	1000	1000
Tyr	-	-	-	230
Phe	505	455	550	540

Tabelle 3 : Aminosäurezusammensetzung von:

Aminosäure	SpL	SpL succ	SpL succI	SpL mal
Lys	554	500	666	547
His	168	110	55	89
Arg	404	430	439	437
Cys	26[+)]			
Asp	740	818	866	865
Thr	436	494	532	525
Ser	512	616	666	655
Glu	765	835	776	892
Pro	596	570	626	567
Gly	876	970	945	1010
Ala	798	870	866	929
Val	497	586	580	647
Met	172	141	129	128
Ile	487	520	503	519
Leu	1000	1000	1000	1000
Tyr	270	288	279	270
Phe	540	570	530	566

[+)]als Cysteinsäure bestimmt.

Die Abkürzungen bedeuten:

SpL Spinatlamellen (lipidfrei)

SpL succ succinylierte Spinatlamellen

SpL succ I Gipfel I der Chromatographie der succinylierten Spinatlamellen über DEAE-Cellulose

SpL mal maleoylierte Spinatlamellen.

Die angegebenen Werte sind Mikromole, bezogen auf Leu = 1000.

7 Enzymatische Hydrolyse mit Thermolysin

Die thermostabile Protease Thermolysin greift Proteine mit ausgedehnten apolaren Bereichen an. Sie hat den Vorteil, daß die Spaltung bei einer Temperatur durchgeführt werden kann, bei der die meisten Proteine denaturiert werden (65°C bis zu 80°C). Aus diesen Gründen schien sie für die Lamellarproteine besonders geeignet.
Die Spaltung wurde bei 65°C drei Stunden lang durchgeführt; danach wurde das Gemisch lyophilisiert.

7.1 Gelfiltration der Peptide

Um den Anteil an ungespaltenem Material zu bestimmen, wurde eine Gelfiltration über Sephadex G-25 durchgeführt (s. Abb. 20):

Abb. 20 : Gelfiltration der Peptide aus der Spaltung mit Thermolysin. Säulenfüllung: Sephadex G 25. Ordinate: Ninhydrinfärbung nach alkalischer Hydrolyse.

Die Abb. 20 zeigt, daß nur ein kleiner ungespaltener Rest bleibt, der mit der Front aus der Säule eluiert wird (1. Gipfel). Der 1. Gipfel enthält außerdem noch das zugesetzte Thermolysin. Die Fraktionen des ersten Gipfels sind leicht gelb gefärbt, die nachfolgenden sind farblos. Der Gipfel mit den Peptiden (2.Gipfel) wurde lyophilisiert.

7.2 Zweidimensionale Papierchromatographie

Der Erfolg der enzymatischen Spaltung wurde mit Hilfe der "Fingerprint-Technik"[35] kontrolliert, einer Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie in zwei zueinander senkrechten Richtungen.

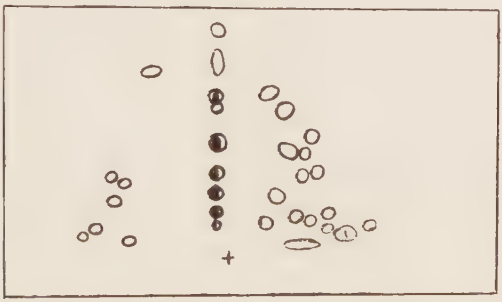

Abb. 21 : Zweidimensionales Papierchromatogramm der enzymatischen Spaltung mit Thermolysin.
Versuchsbedingungen:
Elektrophorese: 70 mA, 2200 Volt, 2 %iger Pyridin-Acetat-Puffer pH 5,4 ; Laufzeit 90 Minuten ;
aufsteigende Chromatographie : System Pyridin/n-Butanol/Wasser (7:7:6), Laufzeit 16 Stunden.
Anfärbung mit Ninhydrin-Sprühreagens.

Die Abb. 21 zeigt ein mit dieser Technik erzieltes Peptidmuster. An der mit einem Kreuz gekennzeichneten Stelle

wurde eine Peptidmenge aufgetragen, die 2 mg ungespaltenem Protein entsprach.
Nach der Anfärbung mit Ninhydrin sind eine Reihe kräftig gefärbter Flecken von neutralen Peptiden festzustellen. Alle anderen Flecken sind wesentlich schwächer gefärbt.

8 Diskussion

Das Lichteinfangsystem der Pflanzen - bei den höheren Pflanzen als Chloroplastenlamellen bzw. Grana ausgeprägt - ist Gegenstand zahlreicher physikalischer Theorien[36-43]. Allgemein anerkannt ist jedoch, daß es sich um ein hochgeordnetes System handelt, in dem die eingefangene Energie sehr schnell (in der Größenordnung von 10^{-10} Sekunden) delokalisiert wird. Sie wandert als "Exciton" zu einem Reaktionszentrum, wo sie das Elektronentransportsystem mit den gekoppelten Reaktionen der ATP-Erzeugung (Photophosphorylierung) und des Calvin-Zyklus' [6] in Gang setzt.

Die Chloroplastenlamellen bestehen zur Hälfte des Trockengewichts aus Protein. Da über die Rolle des Proteins nur Vermutungen vorliegen und da auch chemische Untersuchungen der Struktur trotz zahlreicher in der Literatur beschriebener Bemühungen nur spärliche Ergebnisse gezeitigt hatten, wurde in dieser Arbeit versucht, mit proteinchemischen Methoden die Proteine nach Art und Anzahl zu charakterisieren und einen ersten Einblick in ihre Konstitution zu erhalten.

Die Versuche blieben solange erfolglos, als die herkömmlichen proteinchemischen Methoden angewandt wurden, wie in Kapitel 2 beschrieben. Neue Ergebnisse stellten sich ein, als es gelang, neue Methoden zu entwickeln, die speziell für die Strukturaufklärung schwerlöslicher Struktur- bzw. Membranproteine geeignet sind.

Chloroplastenlamellen aus Spinat wurden auf ihr Verhalten in der Gelelektrophorese und Gelfiltration untersucht. Dabei ergab sich, daß sie aus drei Proteinen bestehen, die α-, ß- und γ-Komponenten genannt wurden. Die ß-Bande besitzt ferner eine Vorbande von wechseln-

der Intensität. Sie ist teilweise stark ausgeprägt (s. Abb 11), teilweise nur als Schulter zu erkennen (Abb. 9, 10, 16). Ob die Komponenten aus einzelnen Polypeptidketten bestehen oder ob sie komplizierter gebaut sind, war noch nicht festzustellen.
Durch diesen Befund wurde die Ansicht widerlegt, daß das Membranprotein der Chloroplastenlamellen einheitlich sei. Diese Ansicht wurde in jüngster Zeit auch von anderer Seite angezweifelt, insbesondere seit gezeigt worden war, daß das "Strukturprotein" der Mitochondrien aus einer größeren Anzahl von Proteinen besteht (s.Abb 22).
Angesichts dieser Ergebnisse stellte sich die Frage nach der Universalität der pflanzlichen Lichtenfangsysteme. Daher wurden die Untersuchungen auf Pflanzen anderer Entwicklungshöhe ausgedehnt: Purpurbakterien (Rhodopseudomonas spheroides), Blaualgen (Oscillatoria chalybea); Grünalgen (Chlorella vulgaris) und einkeimblättrige Pflanzen (Hemerocallis fulva L.).
Dabei zeigten die höheren Pflanzen und Chlorella grundsätzlich das gleiche Bild, während Rhodopseudomonas und Oscillatoria andere Strukturen verwenden.

Diese Ergebnisse stützen auf molekularer Grundlage die seitherigen Annahmen[44] über die Phylogenie der Pflanzen. Danach gab es im Präkambrium (vor etwa 1500 - 2500 Millionen Jahren) z w e i größere Pflanzenstämme: einmal die Blaualgen und Bakterien, die unter dem Begriff Spaltpflanzen (Schizophyta) zusammengefasst werden; zum anderen niederste Algen, aus denen sich noch im Präkambrium einerseits die Tiere, andererseits die Pflanzen (Algen) entwickelten. Aus den Algen entstanden im Silur und Devon (vor 430-460 Millionen Jahren) die ersten Landpflanzen, von denen unsere heutige Flora abstammt.

Der eine der beiden im Präkambrium existierenden Pflanzenstämme wird durch jene Pflanzen repräsentiert,

die das Bandenmuster mit drei Hauptbanden zeigen. Dabei ergibt sich der erstaunliche Befund, daß Pflanzen, deren Entstehung 400 Millionen Jahre oder länger auseinander liegt, im Aufbau ihres Photosyntheseapparates sehr ähnlich sind.
Eine solche s t r u k t u r e l l e I n v a r i a n z wurde auch an einem anderen Strukturprotein festgestellt: elektronenmikroskopische Studien am Kollagen, dem Gerüstprotein der Tiere, weisen auf eine gleiche Struktur bei entwicklungsgeschichtlich sehr verschiedenen Tieren hin[45].

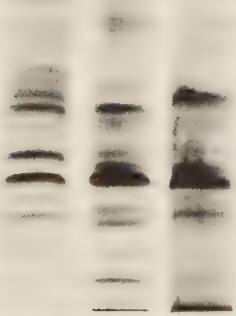

Abb. 22 : Unlösliche Mitochondrienproteine aus verschiedenen Organismen, getrennt durch Gelelektrophorese im Phenolsystem.
Von links nach rechts:Neurospora crassa Wildtyp, Locusta migratoria (afrikan.Wanderheuschrecke), Rattenleber.
(Aufnahme v.Dipl.Chem. W.Sebald, Physiol.chem. Institut der Universität München).

Der andere der beiden präkambrischen Pflanzenstämme - die Spaltpflanzen umfassend - existiert heute noch fast unverändert. Er wird durch die Abbildungen 6 und 7 (S. 18) repräsentiert. Dabei legt die Verschiedenheit von Purpurbakterien und Blaualgen die Annahme nahe, daß es sich nicht um einen, sondern um zwei phylogenetisch verschiedene Stämme handelt.

Bei den hier vorgelegten entwicklungsgeschichtlichen Studien wurden - unter Verzicht auf Vollständigkeit - nur einige wenige Pflanzen untersucht.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten bietet die Genetik. So konnte beispielsweise in Zusammenarbeit mit Herrn F. Herrmann (Institut für Kulturpflanzenforschung, Aschersleben, DDR) bei einer höheren Pflanze eine Mutante gefunden und untersucht werden, die Einzelreaktionen der Photosynthese nicht mehr durchführen kann. Diese Mutante zeigte auch in der Gelelektrophorese ein unterschiedliches Bandenmuster.
Auf Grund solcher Versuche wird es vielleicht in naher Zukunft möglich sein, den aufgefundenen Strukturen bestimmte Funktionen zuzuordnen.

Beim Hämoglobin, dem roten Blutfarbstoff der Tiere, haben zahlreiche Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Braunitzer gezeigt, daß bei verschiedenen Organismen beträchtliche Abwandlungen sowohl der Zahl der Proteine als auch der Primärstruktur vorliegen. Hier ist die Primärstruktur variabel, sofern nur die Tertiär- und Quartärstruktur erhalten bleibt.
Gegenüber der Variabilität der Zahl der Hämoglobine bei verschiedenen Tieren fällt die Konstanz der Zahl der Proteinkomponenten in den Chloroplastenlamellen der Pflanzen ins Auge. Dabei ist der Zeitraum, der für die Entwicklung der Tiere veranschlagt wird, kleiner als die

Entwicklungszeit der Pflanzen. Die Erklärung dürfte im unterschiedlichen Funktions- und Strukturprinzip zu finden sein. Hämoglobin liegt als einzelnes Teilchen frei in wässriger Lösung vor, d.h. es hat praktisch keine Nachbarn, die strukturelle Anforderungen stellen.

Ganz anders das Lamellarprotein der Chloroplasten. Es muß zusammen mit den Lipiden eine definierte Struktur bilden. Da die strukturellen Anforderungen an ein System, das zur Resonanz, d.h. zur Delokalisation von Anregungsenergie fähig sein soll, äußerst hoch sind, werden nichtletale Mutationen viel seltener sein als bei frei beweglichen Molekülen. Mit anderen Worten: die Tertiär- und Quartärstruktur - sofern man Komplexe dieser Größenordnung so bezeichnen kann - ist bei Struktur- bzw. Membranproteinen wesentlich strenger von der Primärstruktur abhängig als bei freibeweglichen Molekülen.

Die große Ähnlichkeit der Chloroplastenlamellen verschiedener Pflanzen, die in den Bandenmustern der Gelelektrophorese zum Ausdruck kommt, zeigt sich auch beim Vergleich der Aminosäure-Bruttozusammensetzung der Proteine. Die Unterschiede in den Aminosäureanalysen der Lamellarproteine verschiedener Pflanzen sind sehr gering.

Vergleicht man die Aminosäureanalysen der α-, ß- und γ-Komponenten einer Pflanze, so werden auch zwischen α- und ß-Komponenten nur sehr geringe Unterschiede gefunden, die zum Teil innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegen. Die γ-Komponente ist jedoch signifikant verschieden. Diese Befunde sind erst deutbar, sobald eine funktionelle Zuordnung der Komponenten möglich wird.

Ob die Gleichartigkeit der Chloroplastenlamellen verschiedener Pflanzen nur auf einem gleichen Bandenmuster der Gelelektrophorese und auf sehr ähnlichen Aminosäureanalysen beruht, oder ob sie sich auch in der Primärstruktur äußert, muß durch Sequenzanalyse entschieden werden.

Um diesem Ziel näherzukommen, wurden einerseits mehrere Verfahren zur präparativen Isolierung der Lamellarproteine entwickelt, zum anderen wurde in der Succinylierung eine Methode gefunden, die Proteine wasserlöslich zu machen, eine Eigenschaft, die die enzymatische Hydrolyse wesentlich erleichtert. So gelang denn auch die Spaltung mit der Protease Thermolysin. Die erhaltenen Peptide wurden mit Hilfe der Print-Methode n. Ingram[35)] charakterisiert. Damit konnte der erste Schritt in Richtung Sequenzanalyse getan werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Aufarbeitung der Pflanzen

a) Spinat-Chloroplastenlamellen:

1 kg Spinat (auf dem Markt gekauft) wurde gelesen, von Stielen befreit und 4 mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurden in einem "Entsafter" (Hersteller: Braun AG) in einem Arbeitsgang die Blätter homogenisiert und der Saft abgeschleudert.

Zur Entfernung von Zellbruchstücken und -kernen wurde der Saft durch Filterpapier filtriert und anschließend 10 Minuten bei 100 g zentrifugiert (MSE High-Speed 18). Das Sediment wurde verworfen, der Überstand 40 Minuten bei 6000 UpM (5600 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde in ca. 200 ml Wasser ca 1 Stunde lang aufgerührt, dann 40 Minuten bei 12000 UpM (23000 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde noch 1 mal mit 1 %iger Kochsalzlösung und 2 mal mit je 200 ml Wasser gewaschen und schließlich lyophilisiert.

Die Aufarbeitung wurde bei 0^{o}- 4^{o}C durchgeführt, um das Wachstum von evtl. eingeschleppten Bakterien und die Wirkung von zelleigenen Proteasen zu unterdrücken.

Die Ausbeute an Lamellen schwankte je nach Art und Herkunft des Spinats zwischen 2-4 g pro kg Spinatblätter.

b) Lamellen aus Hemerocallis fulva L. (gelbrote Taglilie)

Die Aufarbeitung dieser Lilie erfolgte analog zu der des Spinats. Da jedoch die Blätter viel harte Fasern enthalten, die den "Entsafter" sehr schnell verstopfen, mußte während der Aufarbeitung laufend mit 0,4 molarer Saccha-

rose-Lösung nachgespült werden. Ausbeute: 1,5 g Chloroplastenlamellen/kg Pflanzenmaterial.

c) Lamellen aus Chlorella vulgaris[46]:

Die Algen wurden 5 Tage lang unter Beleuchtung in steriler Nährlösung kultiviert, dann abzentrifugiert (3000 UpM, 5 Minuten). Das Zentrifugat wurde in 0,4 molarer Saccharose aufgenommen und in einem Glasperlenhomogenisator nach Merkenschlager[47] homogenisiert. Ein Abstrich zeigte nur noch wenige intakte Algen. Es wurde abdekantiert und bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 20 000 UpM (Spinco, Rotor 30) 30 Minuten lang zentrifugiert, noch 2 mal mit Wasser gewaschen und schließlich lyophilisiert.

Das W-Protein[14]

1 g Chloroplastenlamellen von Spinat wurden in 25 ml reiner Ameisensäure gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde mit 125 ml Eisessig und 2 ml Benzol versetzt, 30 Minuten gerührt und zentrifugiert. Der Überstand wurde langsam in 350 ml eines Äther-Petroläther-Gemisches (6:1) von -40°C eingerührt. Nach 30 Minuten wurde es abzentrifugiert (15 Minuten, 3000 g), das Sediment in 20 ml Ameisensäure gelöst und nach 3 Stunden wiederum mit Äther-Petroläther-Gemisch (6:1) gefällt und zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde wieder in 20 ml Ameisensäure gelöst, auf das 10-fache Volumen verdünnt, dialysiert, durch Einstellung auf pH 5,2 ausgefüllt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde in Wasser suspendiert und durch Einstellen auf pH 10 in Lösung gebracht. Ausbeute: 440 mg, d.h. 44 % des Gesamtgewichts der Lamellen.

Die Lösung dieses Rohprodukts wurde weiter gereinigt durch Gelfiltration über eine Säule (2x100 cm) aus Sephadex

G-100, äquilibriert mit einem Puffer aus M/100 Tris-HCl vom pH 8,1 und 7 molarem Harnstoff.

Der Hauptgipfel (1.Gipfel) wurde entweder gegen Wasser dialysiert oder mit Hilfe einer Säule (2x100 cm) aus Sephadex G-25 von Salz und Harnstoff befreit und in eine 1 %ige Ammoniumbicarbonat-Lösung überführt. Diese Lösung konnte lyophilisiert werden.

Stärkegel-Elektrophorese

Eine 10 %ige Lösung der nach Smithies[48] präparierten Stärke in 0,005 molarem Tris-HCl-Puffer vom pH 8,6 wurde auf Objektträger gegossen. Nach dem Erkalten wurde mit einer Rasierklinge ein Schlitz eingeschnitten, in den die Lösung des Proteins entweder direkt oder mit Stärke angeteigt oder auf Filterpapier aufgesogen eingeführt wurde.

Die Stromzuführung erfolgte über Filterpapierbrücken, die in den Elektrodenpuffer eintauchten. Die Versuchsbedingungen waren: 1,0 mA bei 200 Volt Spannung, Laufzeit 10 Stunden bei 4°C. Angefärbt wurde mit einer 0,55 %igen Lösung von Amidoschwarz in 7,5 %iger Essigsäure.

Polyacrylamidgel-Elektrophorese im Phenolsystem

Polymerisationsmischung:

Lösung 1: 30,0 g Acrylamid,
1,2 g Bis (Methylen-bis-acrylamid)
4 mg Kalium-Ferrizyanid
wurden in Wasser gelöst und auf
100 ml aufgefüllt.

Lösung 2: 140 mg Ammonium-Peroxodisulfat
in 100 ml Wasser

Um mit anderen Porenweiten arbeiten zu können, mußte außer der Acrylamid-Konzentration auch das Verhältnis

von Acrylamid zu Bis geändert werden. Es betrug:

bei	5	%igem Gel	25
	7,5	" "	37,5
	10	" "	50
	15	" "	75.

8 ml Lösung 1 wurde mit 28 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin) und mit 24 ml frisch bereiteter Lösung 2 vermischt, mit Wasser auf 48 ml aufgefüllt und im Vakuum entgast.

Die Mischung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch einen Rahmen aus Plexiglas in einem Abstand von 2 mm gehalten wurden.
Nach einigen Stunden war die Lösung durchpolymerisiert. Nach Abheben einer Glasplatte konnte das Gel herausgelöst werden. Danach wurde es in Stücke passender Größe geschnitten. Die Gelstücke wurden ca 10-20 Stunden gewässert, sodann 2 mal 5 Stunden in einer Mischung aus 2 Gewichtsteilen Phenol, 1 Volumteil Ameisensäure und einem Volumteil Wasser bewegt (Elpho-Schaukelgerät der Fa. Bender u. Hobein, München).

Nach dieser Vorbehandlung wurde das Gel mit Filterpapier abgetrocknet, unter Vermeidung von Luftblasen auf eine Glasplatte gelegt und mit einer Rasierklinge ein Schlitz eingeschnitten. Das zu analysierende Proteingemisch wurde in Phenol/Eisessig/Wasser (2:1:1) gelöst (3,5 mg Protein/ml) und der Schlitz damit völlig gefüllt. Die Verbindung mit dem Elektrodengefäß wurde durch Filterpapierbrücken hergestellt, die mit 10 %iger Ameisensäure getränkt waren. Als Elektrodenpuffer diente ebenfalls 10 %ige Ameisensäure.
Nach Einbringung der Substanz wurde das Gel bis zum Schlitz mit PVC-Folie abgedeckt.

Die Elektrophorese-Bedingungen waren wie folgt: 20 mA bei einer Spannung von 150 Volt; Laufzeit 4 Stunden bei

Raumtemperatur. Während des Laufs wurde der Schlitz immer wieder mit Puffer aufgefüllt.

Die Anfärbung erfolgte mit Amidoschwarzlösung, die Entfärbung durch Auswaschen mit 7 %iger Essigsäure.

Entfernung der Lipide und Chlorophylle

Chloroplastenlamellen wurden in 50 %iger Propionsäure gelöst (3 %ig) und die Lösung langsam in das 30-fache Volumen Aceton von -20°C eingerührt. Nach halbstündigem Stehen wurde abzentrifugiert und das Sediment in 50 %iger Propionsäure gelöst. Dann wurde solange Wasser zugegeben, bis die Lösung 5 %ig an Propionsäure war. Diese Lösung konnte lyophilisiert werden. Das Produkt war ein gelbliches Pulver.

Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid

400 mg lipidfreie Chloroplastenlamellen wurden in 40 ml einer 0,5 %igen Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, die 10 molar an Harnstoff war, gelöst. Im Laufe einer halben Stunde wurden bei Raumtemperatur 800 mg Succinanhydrid in kleinen Portionen zugegeben. Dabei wurde der pH-Wert durch Zugabe von 5-normaler Natronlauge mit Hilfe eines pH-Staten konstant bei 8,0 gehalten.

Nach Beendigung der Umsetzung wurde die Lösung durch Gelfiltration über Sephadex G-25 von Salzen und Harnstoff befreit und in eine 0,5 %ige Ammoniumcarbonat-Lösung überführt, die lyophilisiert wurde. Die Ausbeute betrug 420 mg Succinylprotein.

Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid

Diese Umsetzung wurde analog der Succinylierung durchgeführt. Lediglich die Reaktionstemperatur wurde auf 0°C gesenkt. Dies erforderte eine Verminderung der Harnstoffkonzentration auf 7 M.

Disc-Elektrophorese[18,19)]

Die Disc-Elektrophorese der in alkalischem Puffer löslichen Proteine und Proteinderivate wurde gemäß Ornstein und Davis mit Hilfe eines Gerätes der Fa. Shandon, Frankfurt durchgeführt. Verwendet wurde ein 10 %iges Gel und ein Gelpuffer vom pH 8,6 (Tris-HCl).

Elektrodenpuffer: 10 g Tris
1,3 g EDTA (Äthylendiamin-Tetraessigsäure)
1 g Borsäure
pro Liter, mit Salzsäure eingestellt auf pH 9,2 und zum Gebrauch im Verhältnis 1: 10 verdünnt.

Der Strom wurde konstant bei 5 mA/Röhrchen gehalten. Die Laufzeit war 60 Minuten.

Gegenstromverteilung [28,29,30)]

Das verwendete System bestand aus Wasser, 2-Butanol und Propionsäure im Volumenverhältnis 11:8, 7:1,5. Außerdem enthielt es 0,2 %o Trichloressigsäure (TCA) (bezogen auf 2-Butanol).

Die mit Aceton extrahierten Lamellen (50mg) wurden in 50 %iger Propionsäure gelöst. Dann wurde nacheinander die dem obengenannten Verhältnis entsprechenden Mengen Wasser, sekundär-Butanol und eine Lösung von TCA in Wasser hinzuge-

fügt. Nach Zentrifugation des Gemischs ergaben sich 2 Phasen, getrennt durch eine Interphase, die entfernt wurde. Diese Operation wurde so oft durchgeführt, bis keine Interphase mehr entstand.

Die beiden Phasen wurden in die Elemente 4-8 einer automatischen Verteilungsapparatur nach Craig eingefüllt. Das Volumenverhältnis betrug 4 ml Oberphase zu 3 ml Unterphase. Die Elemente 1-3 dienten zur Äquilibrierung der einlaufenden Oberphase. Zur Äquilibrierung der Unterphase wurden vor der Substanz ca. 20 Elemente mit Oberphase gefüllt.
Die Absitzzeit betrug am Anfang 70 Minuten, nach 10 Schritten 60 Minuten, nach 30 Schritten 30 Minuten. Zur Analyse des Laufs wurden beide Phasen aus den einzelnen Elementen entnommen, zur Erzielung einer homogenen Phase mit o,5 ml Methanol versetzt und durch Messung der Extinktion bei 275 nm sowie durch Ninhydrinanfärbung nach alkalischer Hydrolyse die Proteinkonzentration bestimmt.

Die vereinigten Fraktionen der Gipfel wurden gegen Wasser dialysiert und lyophilisiert.

Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose

Vorbehandlung:

Die käufliche Diäthylamino-äthyl-Cellulose (Serva, Heidelberg) wurde mit 1 normaler Salzsäure, dann mit 1 normaler Natronlauge, wieder mit 1 normaler Salzsäure und schließlich mit Wasser gewaschen. Zur Entfernung kleiner, die Säule verstopfender Teilchen wurde die Cellulose mehrere Male in Wasser suspendiert und nach 30 Minuten Absitzzeit der trübe Überstand dekantiert.

Durch Saugfiltration wurde der größte Teil des Wassers entfernt, die Cellulose in Äquilibrierpuffer (n/15 Natriumphosphatpuffer pH 7,4) aufgeschlämmt und die Suspension

mit Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt. Der Austauscher wurde noch mehrmals mit Puffer gewaschen, in die Säule eingeschlämmt und einen Tag lang äquilibriert.

Chromatographie:

Für die Reinigung von 530 mg des Succinylproteins (für Maleinylprotein gilt dasselbe) war eine Säule von 80 cm^3 Inhalt (2x25 cm) ausreichend. Die gegen den Äquilibrierpuffer dialysierte Proteinlösung hatte ein Volumen von 30 ml.

Als Puffer wurden verwendet:

Äquilibrierpuffer: n/15 Natriumphosphatlösung pH 7,4
Gradientenpuffer: n/15 Natriumphosphatlösung pH 7,4 + 2 n NaCl

Die Elutionsgeschwindigkeit war: 2 Fraktionen á 7,2 ml pro Stunde.

Nach dem Auftragen der Proteinlösung wurde zunächst mit Äquilibrierpuffer eluiert; nach 35 Fraktionen wurde der Gradient an ein Mischgefäß von 250 ml Inhalt angeschlossen. Nach 150 Fraktionen wurde der Rest des Proteins mit Äquilibrierpuffer eluiert, der 1 %ig an SDS war. Vor Anlegen dieses Puffers wurden einige ml Äquilibrierpuffer durch die Säule gepumpt, um eine Aussalzung des SDS durch Kochsalz zu vermeiden.

Zur Auswertung der Chromatographie wurden drei Kriterien angewandt: die Extinktionen bei 660 nm und 275 nm sowie die spektrophotometrische Bestimmung der Ninhydrinanfärbung bei 578 nm nach alkalischer Hydrolyse von Aliquoten der Fraktionen. Der erstere Meßwert erfaßt jeweils den Anteil an Chlorophyll und verwandten Substanzen, der zweite den Gehalt an aromatischen Aminosäuren (besonders Tyr und Try), der letzte den Gehalt an Aminosäuren bzw. Protein.

Enzymatische Hydrolyse mit Thermolysin[49)]

100 mg acyliertes Protein wurden mit einer Lösung von 2 mg Thermolysin (Fa. Daiwa Kasei K.K., Osaka, Japan) in 2 ml 0,05 molarem Tris-HCl-Puffer pH 8,0 versetzt der 0,001 molar an Calciumchlorid war. Nach Zugabe von weiteren 8 ml dieses Puffers wurde die Mischung gerührt, bis alles Protein in Lösung gegangen war. Dann wurde die Lösung 2 Stunden lang auf 65°C erwärmt, noch 1 ml der 0,1 %igen Thermolysinlösung zugegeben, eine weitere Stunde bei 65°C gehalten und schließlich lyophilisiert.

Zweidimensionale Papierchromatographie (Print-Technik)

a) Hochspannungs-Papierelektrophorese

Zur Kontrolle der enzymatischen Spaltung wurde diese in soviel Wasser gelöst, daß sich eine Konzentration von 30 mg eingesetztem Protein pro ml ergab. Von dieser Lösung wurden 0,05 ml auf einen Papierbogen (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) von der Größe 28x60 cm getüpfelt, dieser dann mit Pyridin-Acetat-Puffer pH 5,4 (4 % Pyridin, 0,8 % Eisessig) besprüht und der Elektrophorese unterworfen. Dabei wurde eine Spannung von 2,2 kV angelegt, bei der sich ein Strom von ca 70 mA ergab. Die Laufzeit betrug 1,5 Stunden.

b) Aufsteigende Chromatographie

Die getrockneten Hochspannungs-Pherogramme wurden 1-2 Stunden über einer Mischung aus n-Butanol-Pyridin/Wasser (35:35:30) äquilibriert und dann in dieser Mischung senkrecht zur Richtung des elektrischen Feldes 16 Stunden lang aufsteigend chromatographiert.

Die Peptiden wurden mit Hilfe der Ninhydrinreaktion sichtbar gemacht, außerdem wurden spezifische Sprühreagentien für Arginin, Tyrosin, Histidin, Tryptophan und Methionin verwandt.

Zusammenfassung

Es wurden drei Methoden gefunden, die Membranproteine aus Chloroplastenlamellen in Lösung zu bringen.

Es wurde eine Technik zur analytischen Auftrennung schwerlöslicher Proteine entwickelt : die Gelelektrophorese im System Phenol/Ameisensäure/Wasser (2:1:1). Damit konnten die Thylakoidproteine aus entwicklungsgeschichtlich verschiedenen Pflanzen aufgetrennt werden. Es zeigte sich, daß die Proteine der Lichteinfangsysteme einer Gruppe von Pflanzen, die die Grünalgen und die höheren Pflanzen einschließt, eine ähnliche Struktur aufweisen: sie bestehen aus drei Komponenten, die mit α, ß und γ bezeichnet werden. Dagegen weisen Lamellen aus Purpurbakterien und Blaualgen eine davon verschiedene Struktur auf.

Es gelang weiterhin, die Lamellarproteine durch Gelfiltration und Genstromverteilung präparativ zu trennen und die Komponenten durch Aminosäureanalysen zu charakterisieren. Während die α- und ß-Komponenten ähnliche Bruttoanalysen liefern, zeigt die γ-Komponente ihnen gegenüber signifikante Unterschiede.

Es wurde eine enzymatische Hydrolyse durchgeführt und die Peptide wurden durch Print-Technik charakterisiert.

Die Ergebnisse werden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Evolution der Pflanzen diskutiert.

Literaturverzeichnis

1 J.R. Mayer, Die organische Bewegung in ihrem Zusammenhang mit dem Stoffwechsel, Heilbronn 1845, zitiert nach Loomis i. Handbuch der Pflanzenphysiologie V/1, S. 95 f., Berlin, Göttingen, Heidelberg 1960

2 R. Willstätter, A. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll, Berlin 1913

3 O. Warburg, E. Negelein, Z.physik.Chem. 106, 191 (1923)

4 R. Hill, Proc.Roy.Soc. (London) B127, 192 (1939)

5 W. Menke in Biochemistry of Chloroplasts, Bd. I, S. 3 ff., T.W.Goodwin (Herausgeber),London und NewYork, 1966

6 M.Calvin, Angew. Chem. 68, 253 (1956)
M.Calvin, Angew. Chem. 74, 165 (1962)

7 R.B.Woodward, Angew.Chem. 72, 651 (1960)

8 J.T.O.Kirk in Biochemistry of Chloroplasts (s. Ref.5), S.319

9 D.I.Arnon, F.R.Watley, M.B.Allen, J.Am.Chem.Soc. 76, 6324 (1954)
D.I.Arnon, Nature 184, 10 (1959)

10 Frebst, A.V., M.Y. Tsuji oto, D.I.Arnon, Nature 182, 351 (1958)

11 W. Kreutz, R. Hosemann, Naturwissenschaften 53, 298 (1966)
W.Kreutz, P.Weber, Naturwissenschaften 53, 11 (1966)

12 E.L.Smith, J. Gen. Physiol. 24, 583 (1941)

13 J.S. Kahn,Biochem. Biophys. Acta 79, 234 (1964)

14 P.Weber, Z.Naturforsch. 18 b, 1105 (1963)

15 W. Menke, E. Jordan, Z.Naturforsch. 14 b, 234 (1959)

16 J.P. Thornber, J.L. Bailey, S.M. Ridley, Biochem.J. 92, 18 P (1964)

17 L. Craig, Arch.Biochem.Biophys. Suppl. 1, 112 (1962)

18 L. Ornstein,Ann.N.Y. Acad. Sci.121, 321 (1964)
19 S.Raymond,L.S.Weintraub, Science 130, 711 (1959)
20 W.M.Mitchell, Biochem.Biophys. Acta 147, 171 (1967)
21 G. Braunitzer, Naturwissenschaften 54, 407 (1967)
22 J.R. Cann,Biochemistry 5, 1108 (1966)
23 G. Braunitzer, G.Bauer, Naturwissenschaften 54, 70 (1967)
24 R. Schmitz, Dissertation, Köln 1966, S. 1
25 K. Mägdefrau in "Die Evolution der Organismen" (Herausgeber G.Heberer), Stuttgart 1959, S. 303
26 R. Schmitz,G.Bauer-Stäb, G.Braunitzer, Z. Naturforsch. 23 b, 284 (1968)
27 K. Hannig, Z. Analyt. Chem. 181, 244 (1960)
28 E. Hecker, K. Allemann, Angew. Chem. 66, 557 (1954)
29 N. Hilschmann, L.C. Craig,Biochemistry 4, 5 (1965)
30 E. Hecker, Verteilungsverfahren im Laboratorium, Weinheim 1955, S. 45 ff.
31 R. Schmitz, Dissertation, Köln 1966, S.33
32 A. Gounaris,G. Perlman, J. Biol. Chem. 242, 2739 (1967)
33 P.J.G. Butler, J.I.Harris, B.S.Hartley, R. Leberman, Biochem. J. 103, 78 P (1967)
34 D.H.Spackman, W.H. Stein, S. Moore, Analytic. Chem. 30, 1190 (1958)
35 V.M. Ingram, Biochim.Biophys. Acta 28, 539 (1958)
36 M. Calvin, G.M. Androes, Science 138, 867 (1962)
37 G. Porter, Proc. Roy. Soc. (London) B 157, 293 (1963)
38 C. Sybesma, J.M.Olson, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49, 248 (1963)
39 J.A. Bassham, J.Theoret.Biol. 4, 52 (1963)
40 R.K. Clayton, Science 149, 1346 (1965)
41 R.A. Cellarius, D.Mauzerall, Biochim.Biophys. Acta 112, 235 (1966)

42 D.I. Arnon, Experientia 22, 273 (1966)

43 H.T. Witt, B. Rumberg, P.Schmidt-Mende, U. Siggel, B. Skerra, J. Vater, J. Weikard, Angew. Chem. 77, 821 (1965)
B.Rumberg, E. Reinwald, H. Schröder, U. Siggel, Naturwissenschaften 55, 77 (1968)

44 S. Strugger in Fischer-Lexikon Biologie I, Frankfurt/Main, 1962, S. 127 ff.

45 A. Nordwig, U. Hayduck, J. Mol.Biol. 26, 351 (1967)

46 P. Weber, Z. Naturforsch. 17 b, 683 (1962)

47 M. Merkenschlager, K. Schlossmann, W. Kurz, Biochem. Z. 329, 332 (1957)

48 O. Smithies, Biochem. J. 61, 629 (1955)

49 H. Matsubara, R. Sasaki. A. Singer, T.H. Jukes, Arch. Biochem. Biophys. 115, 324 (1966)

Lebenslauf

Als Sohn des Drogisten Albert Bauer und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Oltsch wurde ich am 20.5.1940 in Ludwigsburg/Württemberg geboren. Dort besuchte ich ab 1946 die Volksschule. Im Jahre 1948 verzogen meine Eltern nach Schwäb. Hall, wo ich zwei weitere Jahre in die Volksschule ging und dann in das Gymnasium bei St. Michael eintrat. Im Frühjahr 1959 erhielt ich dort das Zeugnis der Reife.

Im Sommersemester desselben Jahres begann ich das Studium der Chemie an der Universität München, wo ich im Februar 1962 das Diplomchemiker-Vorexamen und im Mai 1965 das Diplomchemiker-Hauptexamen ablegte. Zwischen den beiden Examina studierte ich ein Semester in Wien.

Seit Mai 1965 bin ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in München mit der Anfertigung von Diplom- und Doktorarbeit beschäftigt.